

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

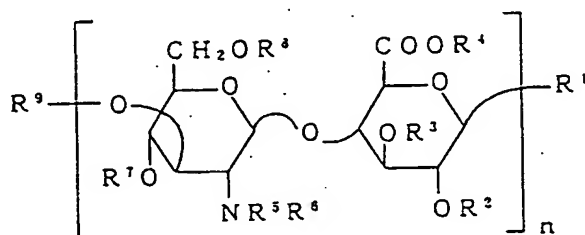


(51) 国際特許分類 <b>C12P 19/26, C07H 7/033, 15/04, A61K 31/70, 31/715, C08B 37/00, C08F 8/00, C09B 201/02, A61L 27/00</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO99/57301</b>  (43) 国際公開日 1999年11月11日(11.11.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02306  (22) 国際出願日 1999年4月30日(30.04.99)  (30) 優先権データ 特願平10/120425      1998年4月30日(30.04.98)      JP 特願平10/273895      1998年9月28日(28.09.98)      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) マルハ株式会社(MARUHA CORPORATION)[JP/JP] 〒100-8608 東京都千代田区大手町1丁目1番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 八塚信明(YATSUKA, Nobuaki)[JP/JP] 佐藤信行(SATO, Nobuyuki)[JP/JP] 森山 茂(MORIYAMA, Shigeru)[JP/JP] 玉井忠和(TAMAI, Tadakazu)[JP/JP] 西川正純(NISHIKAWA, Masazumi)[JP/JP] 〒300-4295 茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP)		(74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国    AU, BR, CA, CN, KR, MX, NO, RU, US, 欧州特 許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: <b>COMPOUNDS HAVING GLUCURONIC ACID DERIVATIVES AND GLUCOSAMINE DERIVATIVES IN THE STRUCTURE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND UTILIZATION THEREOF</b>  (54) 発明の名称    グルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その製造法およびその用途  <div style="text-align: center;"> <p style="text-align: right;">(I)</p> </div>  (57) Abstract 1) Compounds having glucuronic acid derivatives and glucosamine derivatives represented by general formula (I) in the structure, pharmacologically acceptable salts thereof and solvates of the compounds or solvates of the salts; 2) a process for producing the compounds 1); 3) medicinal compositions containing the compounds 1); 4) polymers having at least one of the compounds 1) as a side chain structure; 5) coatings containing as the active ingredient at least one of the compounds 1) or polymers thereof; and 6) molded articles, artificial organs, medical instruments and devices for cell culture produced by using the polymer 4) and/or the coatings 5).		

# (57)要約

①下記一般式（１）で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物、②前記①の化合物の製造方法、③前記①の化合物を含有する医薬組成物、④前記①の化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子、⑤前記①の化合物又は高分子を少なくともひとつの有効成分とするコーティング剤、および⑥前記④及の高分子び／又は⑤のコーティング剤を用いて製造した成型物、人工臓器、医療用具、細胞培養器材。

式（１）



PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EES	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

グルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、  
その製造法およびその用途

技術分野

- 5      本発明は、新規なグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その製造法、それを含有する医薬組成物およびそれを側鎖構造にもつ高分子、それらを用いて製造した成型物およびその成型物を部品として用いて製造した人工臓器、医療用具、細胞培養器材に関する。

10    背景技術

- 血栓症は欧米および近年の日本における主要な死因のひとつであり、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈性疾患を合計すると、癌を越える最大の死因である。血栓症には様々な要因があるが、動脈硬化などの血管の病変がその基盤となっていることが多い。正常血管は血管内皮細胞によって高度に抗血栓化されているが、動脈硬化果などの血管病変部位では活性化している血管内皮細胞、あるいは、傷害によって露出した血管内皮下組織に血小板が粘着して病的血栓が形成されやすくなっている。病的血栓の形成を抑制する薬剤として、血小板の粘着や凝集を抑制する薬剤、いわゆる、「抗血小板剤」が注目され臨床的に広く用いられつつあるが、抗血小板剤の歴史は比較的新しく、より優れた薬剤の開発が期待されている。

- 20    上述したように、正常血管は血管内皮細胞によって高度に抗血栓化されているが、ここで血管内皮細胞の役割をさらに詳しくみると、血管内皮細胞は、全身の血管内腔を連続して被覆する一層の細胞群である。正常な血管内皮細胞は、①血管透過性の抑制、②血管内腔の抗血栓化、③血管平滑筋の弛緩、収縮の調節、④血管壁細胞の遊走や増殖の制御のような多彩な機能を果たしており、血管内皮  
25    細胞は血管を血管たらしめる中心的存在であると言われている。

ヒトは血管とともに老いるといわれており、血管壁は年齢とともに障害を受ける。血管壁が障害を受けて破綻すると、血管の破綻は心筋梗塞、大動脈瘤、脳卒中、あるいは壊死といった循環器疾患の形で現れる。血管壁の破綻の最大の原因は動脈硬化である。

現在の動脈硬化の治療又は予防は、そのほとんどが脂質代謝の改善という面からのアプローチであり、薬剤としては抗高脂血症剤が汎用されている。その他、動脈硬化部位の血管の閉塞を防ぐ目的で抗血小板剤や抗血液凝固剤が投与される。しかし、これらの薬剤は、血管壁の破綻を積極的に治療するものではなく、破綻

5 の原因の一つである高脂血症あるいは破綻の進展原因の一つである血栓形成を押さえ込むことによって破綻の進展を防ぐという間接的な作用を期待するものである。

動脈硬化の発症、進展には、血管内皮細胞の損傷や機能喪失が重要かつ不可欠であるとされている。前述のように、従来の療法では、治療を行ううえで最も重

10 要な血管の破綻の根本的原因の解消、即ち血管内皮細胞の再生および機能回復については単純に生体がもつ修復機能に依存するのみであった。従って、損傷を受けて本来の機能を喪失した血管内皮細胞の再生や機能回復を促進する、いわゆる「血管内皮再生療法」は従来の治療法の欠点を克服し得る極めて有用な治療法であるといえる。しかし、血管内皮再生療法に利用しうる薬剤は実用化されておら

15 ず、優れた薬剤の開発が望まれている。血管内皮再生療法の例としては、実験的に傷害したウサギの血管内皮障害部位に血管内皮細胞成長因子（VEGF）の遺伝子を導入して VEGF を発現させ、その有効性を検討した報告（Asahara, T. et al., Circulation, 94, 3291, 1996）などがある。

経皮経管的冠動脈形成術（PTCA）は、血管内に入れたバルーンカテーテルを

20 膨らませ（バルーニング）、動脈硬化の進展によってできた狭窄部位を拡張する手法であり、冠動脈硬化症の確立された治療法の一つである。しかし、術後6ヶ月以内に30～50%の患者に再狭窄が認められ、大きな問題となっている。再狭窄は、バルーニングによって引き起こされ、急激に進行する一種の動脈硬化症であるといえる。これまで、バルーニングの手技の工夫やカテーテルの改良など

25 とともに様々な薬剤を用いた治療が試みられてきたが、未だに充分であるとはいえず、より優れた治療法や薬剤の開発が期待されている。血管内皮再生療法ならば、PTCA後の再狭窄を効果的に予防できると考えられ（前記のAsaharaらの報告を参照されたい）、これに用いる優れた薬剤の開発が期待されている。

心筋梗塞などの虚血性疾患の予後は、多くの因子によって影響を受けるが、側

副血行路の発達の程度は、最も重要な予後決定因子の一つであると考えられている。側副血行路の十分な発達があれば、狭窄や閉塞（梗塞）が生じて、虚血や組織の壊死が押さえられ、梗塞サイズの縮小や予後の改善が得られる。従来、側副血行路形成の機序として、血管内圧や血流の変化が重要視されてきたが、側副血行路形成時に血管内皮細胞や血管平滑筋細胞にDNA合成を伴う細胞分裂像が認められることが報告され、側副血行路の形成過程は、単に既存の吻合血管の物理的要因による拡張だけでなく、少なくともその一部は血管壁構成細胞の増殖が関与する血管新生過程であると理解されるようになっている。近年、「血管新生療法」という新しい治療法によって虚血性心疾患を治療しようとする試みがなされている（例えば、Yanagisawa-Miwa, A. et al., Science, 257, 1401, 1992）。血管新生療法とは、虚血組織周辺の血管新生を促進することによって積極的に側副血行路を確保し、虚血組織を保護しようとする試みであり、"pharmacological bypass therapy (薬物投与によるバイパス形成療法)"ともいえる新しい治療法である。しかし、未だに実用化には至っておらず、これに用いることのできる優れた薬剤や治療法の開発が期待されている。また、血管新生促進活性をもつ物質（例えば、線維芽細胞成長因子）を創傷の治療に利用する試みがなされている（Hockel, M. et al., Arch. Surg., 128, 423, 1993などを参照されたい）。

人工臓器とは、心臓、血管、心臓弁、肺、脾臓、腎臓、肝臓、皮膚、粘膜などの各種の生体組織および臓器の機能を人工的な材料を用いた成型物やそれを部品として用いた装置によって補助あるいは代行しようとするものである。人工臓器は、生体内に埋入したり、血管へのカニューレーションによって引き出した血液を接触させることによってその機能を発揮するため、それらに用いる材料は生体に害を与えることなく使用できる性質、つまり、生体適合性をもたなければならない。人工臓器の生体適合性を規定する最も重要な生体の反応は血栓形成反応である。

血小板の粘着と凝集は、血液凝固系たん白質の活性化とならぶ血栓形成反応に関与する重要な生体反応のひとつであり、正常な生体防御システムに不可欠な止血機能のために存在する。しかし、血液が人工臓器に接触したときにも血小板の粘着と凝集を経た血栓形成が引き起こされる可能性がある。血栓が形成されると、

人工臓器は本来の機能を果たすことができなくなる。血栓が形成されるような不都合を避けるために、血小板の粘着凝集を引き起こさない材料、すなわち、抗血栓性材料の開発が試みられてきた。さまざまな検討が盛んに行われてきたが、いまだに充分といえるものではない。優れた人工臓器の開発に不可欠であるより優れた抗血栓性材料の開発が期待されている。

血栓形成を避けるために、血液と接触しても血栓を形成しない材料、すなわち、抗血栓性材料の開発が試みられてきた。体内で血液と直接触れるのは血管内皮を構成する血管内皮細胞であり、正常な血管内皮細胞の上では血栓は形成されない。当然のことではあるが、最も優れた抗血栓性材料は天然の抗血栓性材料である血管内皮細胞といえる。本来の臓器と同様に人工臓器の血液接触面が血管内皮細胞で被覆されていれば、血栓形成反応は起こらない。血管内皮細胞の抗血栓性を積極的に利用した人工臓器を開発する試みとして新生内膜治癒促進型人工血管などの臨床応用が試みられており、ある程度の成果が得られている（例えば、Noishiki, Y. et al., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs., 27, 309, 1986）。  
これまで、細胞親和性の高い材料を用いたり、成型物の有孔性を高くすることによって細胞侵入を促進するなどといった方法でアプローチがなされているが、血管内皮細胞の成長を促進する物質を利用して血管内皮細胞の被覆を促進するといった試みはほとんどなされていない。

また、人工臓器以外にも、血液と接触する機会のある医療用具も接触によって血小板の粘着凝集が起こることが不都合であるため、抗血栓性をもつ材料を用いることが望ましい。これらの理由からも、より優れた抗血栓性材料の開発が期待されている。

さらに、血管内皮細胞の成長促進作用をもつ物質は細胞培養用組成物や細胞培養用器材の材料としても利用可能である。

#### 発明の開示

上記の記述から明らかなように、優れた抗血小板剤および抗血栓性材料の提供は医療上の重要な課題である。

さらに、優れた血管内皮細胞増殖促進物質および血管内皮細胞増殖促進作用を

本発明者らは、かかる課題を解決するために鋭意研究を重ねてきた結果、一般式（１）に示される化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物が優れた血小板粘着凝集抑制作用を有することを見だし、さらに、その化合物を側鎖構造として有する高分子が優れた血小板粘着抑制作用を有することを見だして本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、下記一般式（１）で表される グルクロン酸誘導体および  
グルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩およ  
び溶媒和物または塩の溶媒和物を提供する。

本発明はさらに、一般式（１）の化合物の少なくともひとつを有効成分とする医薬組成物を提供する。前記医薬組成物は血栓症治療薬および予防薬、循環器疾患治療薬および予防薬、脳血管障害治療薬および予防薬、末梢血管障害治療薬および予防薬として有用である。

本発明はさらに、一般式（１）の化合物を有効成分とする血管内皮細胞増殖促進剤を提供する。前記血管内皮細胞増殖促進剤は血管内皮再生療法のための治療薬または予防薬、血管新生療法のための治療薬または予防薬として有用である。

本発明はさらに、一般式（１）の化合物、あるいは前記高分子の少なくともひ

とつを有効成分とするコーティング剤を提供する。

本発明はさらに、前記高分子の少なくともひとつを材料として用いた成型物を提供する。

- 5 本発明はさらに、前記コーティング剤の少なくともひとつを使用して製造した成型物を提供する。

本発明はさらに、前記成型物の少なくともひとつを部品として用いた人工臓器を提供する。

本発明はさらに、前記成型物の少なくともひとつを部品として用いた医療用具を提供する。

- 10 本発明はさらに、前記高分子を有効成分として含む細胞培養用組成物を提供する。

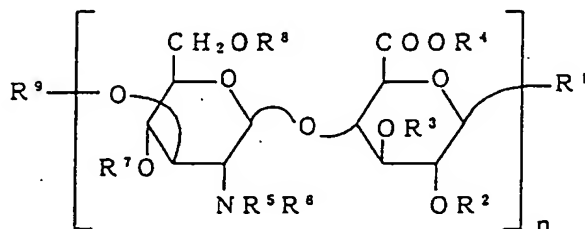
本発明はさらに、前記成型物および／またはコーティング剤を使用して製造した細胞培養用器材を提供する。

# 15 発明を実施するための最良の形態

## [本発明の化合物]

本発明の化合物は、下記一般式（１）で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物である。

式（１）



- 20 [式（１）中、 $R^1$ は保護基または下記式（２）～（５）を表す。式（２）～（５）中、 $R^{10}$ は水素原子、保護基または下記式（６）～（８）を表し、 $R^{11}$ は水素原子または保護基を表す。ただし、 $R^{10}$ および $R^{11}$ が水素原子または保護



基である場合、 $R^1$ は $COOR^4$ に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。

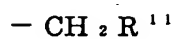
式(2)



式(3)



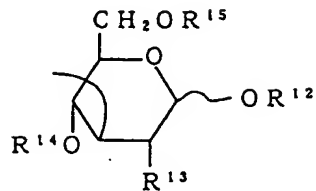
式(4)



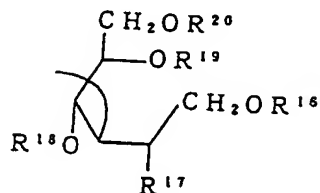
式(5)



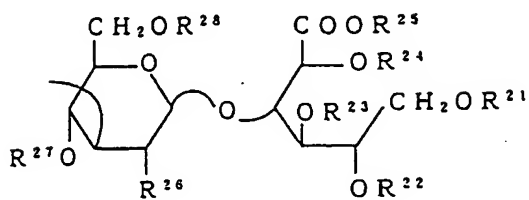
式(6)



式(7)

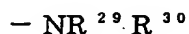


式(8)



また、 $R^{10}$ が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ および $R^{26}$ を除く $R^{12} \sim R^{28}$ は同一または異なって水素原子または保護基を表し、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ および $R^{26}$ はアジド基または下記式(9)を表す。

式(9)



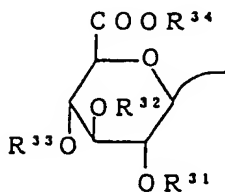
式(9)中、 $R^{29}$ および $R^{30}$ は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。

5

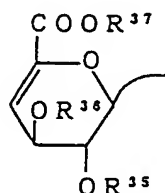
式(1)中、 $R^2 \sim R^8$ は同一または異なって水素原子または保護基を表す。

式(1)中、 $R^9$ は、水素原子、保護基または下記式(10)または下記式(11)を表す。

式(10)



式(11)



式(10)および(11)中、 $R^{31} \sim R^{37}$ は同一または異なって水素原子または保護基を表す。

10

式(1)中、 $n$ は0～25の整数を表す。

(ただし、 $n$ が0のときは、 $R^1$ は式(2)、 $R^{10}$ は式(8)で表される基であり、 $R^9$ は式(10)または式(11)で表される基である。)

式(1)、式(6)～(8)および式(10)～(11)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアル

15

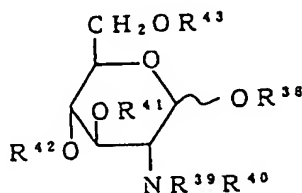
キル、置換されていてもよい炭素原子数 2～8 の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数 1～8 のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、また  $R^{13}$ 、 $R^{17}$  および  $R^{26}$  を除く  $R^2 \sim R^{37}$  の任意の保護基 2 つが一緒になって、置換されて

5 いてもよい炭素原子数 3～8 のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数 3～8 の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。

また、 $n$  が 2 以上の場合、 $R^2 \sim R^8$  は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なっているてもよい。]

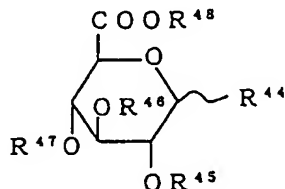
- 10 すなわち、式 (1) で表される本発明の化合物は、下記式 (12) で表される D-グルコサミン誘導体と式 (13) で表される D-グルクロン酸誘導体が結合した構造を有する。

式 (12)



[式 (12) 中、 $R^{38} \sim R^{43}$  は水素原子または保護基を表す。]

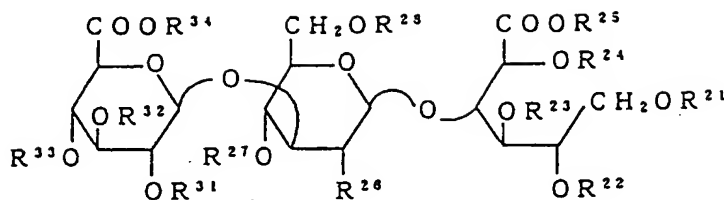
式 (13)



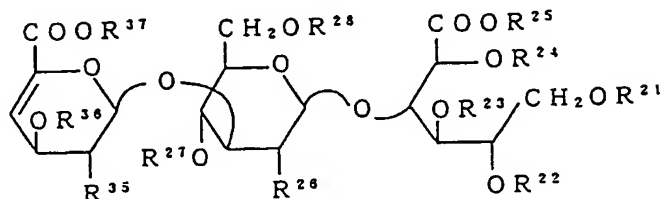
[式 (13) 中、 $R^{44}$  は水酸基または保護基を表し、 $R^{45} \sim R^{48}$  は水素原子または保護基を表す。]

- 15 式 (1) において、 $n$  は 0～25 の整数を表すが、 $n$  が 0 のとき  $R^1$  は式 (2)、 $R^{10}$  は式 (8) で表される基であり、 $R^9$  は式 (10) または (11) で表される基である。すなわち、式 (1) の化合物は下記式 (14) または (15) で表される。

式 (14)



式 (15)



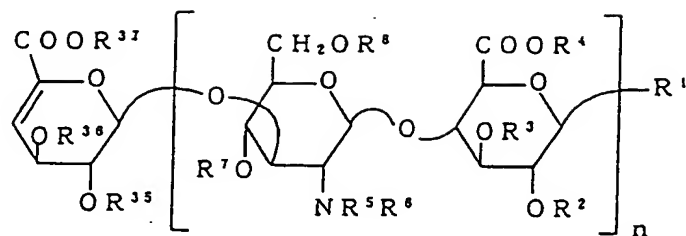
本発明でいう保護基とは、Theodra W. Green 著の “Productive Groups in Organic synthesis” ; 第2判 ; 1991年刊に表されている各種の保護基を含むものである。

- 上記式 (1) ~ (11) 中で示される保護基は、置換されていてもよい炭素原子数 1 ~ 8 の直鎖または分枝鎖のアルキルとしては例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、第三級ブチル、ペンチル、オクチル、メトキシメチル、第三級ブチルチオメチル、1-エトキシエチル、シロキシメチルまたは2-メトキシエトキシメチルなどを表し、置換されていてもよい炭素原子数 2 ~ 8 の直鎖または分枝鎖のアルケニルとしては、例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、ブテニルまたはオクテニルなどを表し、置換されていてもよい 1 ~ 8 の直鎖または分枝鎖のアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、バレリルまたはピバロイル、またはハロゲン化アシルなどを表し、ハロゲン化アシルとしては例えば、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチルなどを表し、置換されていてもよい芳香族アシルとしては例えば、ベンゾイル、パラクロロベンゾイルなどを表し、置換されていてもよい芳香族アルキルとしては、例えば置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよいジフェニルメチルまたは置換されていてもよいトリフェニ

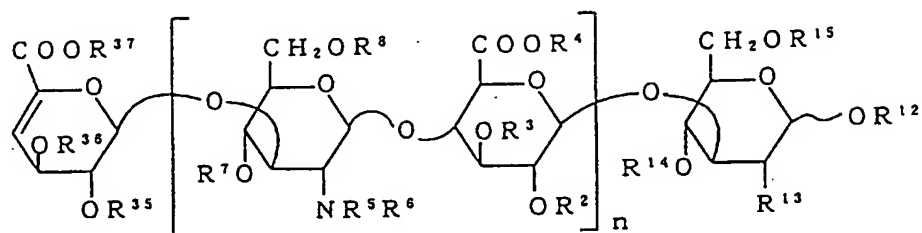
- ルメチルなどを表し、置換されていてもよいベンジルとしては、例えば4-メトキシベンジルなどを表す。さらに、式(1)～(11)中で示される保護基は、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ および $R^{26}$ を除く $R^2 \sim R^{37}$ の任意の保護基2つが一緒になって、1つの保護基を表してもよく、即ち置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデンとしては例えば、プロピリデン、ブチリデンまたはオクチリデンなどを表し、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデンとしては例えば、シクロペンチリデン、シクロヘキシリデンまたはシクロヘプチリデンなどを表し、さらに、置換されていてもよいベンジリデンまたは置換されていてもよいフタロイルなどを表す。水酸基の保護基としては置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖アシル、置換されていてもよい芳香族アルキル、置換されていてもよい炭素原子数2以上の直鎖または分枝鎖のアルケニルまたは置換されていてもよいベンジリデンなどが好ましく、さらに好ましくはアセチル、ベンジル、1-プロペニルまたはベンジリデンなどを表し、アミノ基の保護基としては、置換されていてもよい炭素原子数1以上の直鎖または分枝鎖のアシルまたは置換されていてもよいフタロイルなどが好ましく、さらに好ましくはアセチルまたはフタロイルなどを表し、カルボキシ基の保護基としては、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキルまたは置換されていてもよい芳香族アルキルなどが好ましく、さらに好ましくは、メトキシ、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、イソペンチルまたはジフェニルメチルなどを表す。上記の保護基は、同一の化合物中で互いに同一でも異なってもよく、任意に選ばれる。
- 式(1)中の $n$ は0～25の整数であり、好ましくは、0～10、特に好ましくは0～5である。

$R^9$ は上記の記載に合致するものであればよいが、特に、前記式(11)であること、すなわち、式(1)の化合物が下記式(16)であることが好ましい。

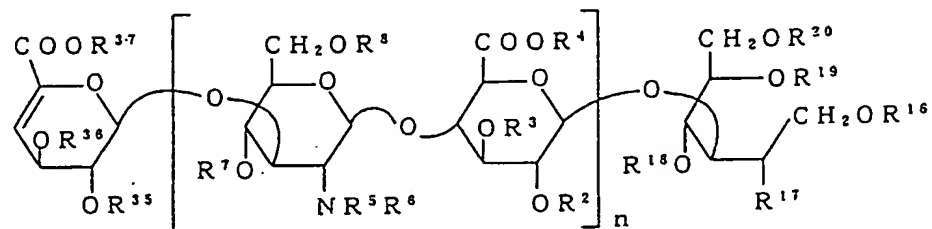
式(16)



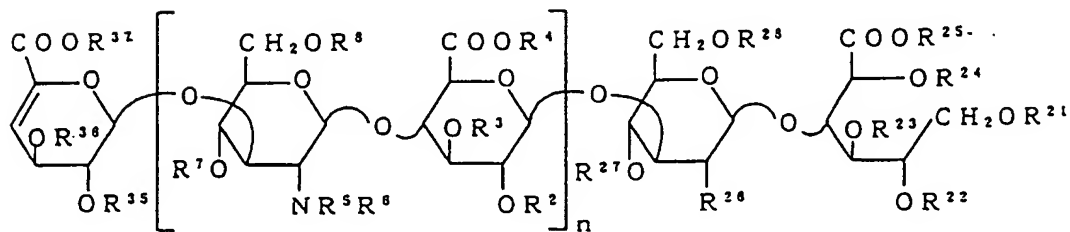
さらにこのとき、式 (11) において、 $R^1$  が前記式 (6) ~ (8) であること、すなわち、式 (1) の化合物が下記式 (17) ~ (19) であることがより好ましい。  
式 (17)



式 (18)



式 (19)



また、さらに前記式 (17) ~ (19) において、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ 、 $R^{26}$ が前記式 (9) であることが特に好ましい。

本発明の化合物は、(A) 血小板粘着凝集抑制作用と、(B) 血管内皮細胞増殖促進作用および血管新生促進作用という2つの異なる作用を有する。(B) の  
5 目的で使用するためには、式 (16) の化合物が特に好ましい。

本発明における薬理学的に許容される塩とは、本発明の化合物を治療に必要な量を投与する場合に、生体に対して悪影響を及ぼさない、あるいは、本発明の化合物の有効な薬理学的な性質を塩としたことで損なわない塩であることを意味する。具体例としては、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、  
10 ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルキルスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのアリールスルホン酸塩；フマル酸塩、コハク酸、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；およびグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩をあげ  
15 ることができる。またさらに、本発明の化合物およびその塩は、薬理学的に許容される各種の溶媒、例えば水、有機溶媒、緩衝液などとの溶媒和物や結晶多形のものなども含まれる。

本発明の化合物は置換基の種類によって不斉炭素原子を有し、不斉中心の存在  
20 に基づく光学異性体が存在する場合がある。本発明の化合物には、各々の異性体、および、それらの混合物のすべてが含まれる。例えば、ある光学異性体とその鏡像異性体（エナンチオマー）との混合物、特に、等量混合物であるラセミ体、また、あるいは、ある光学異性体とそのジアステレオマーとの混合物も含まれる。

#### 25 [本発明の化合物の製造法]

当然のことではあるが、本発明の化合物を得る方法には種々の方法がある。例えば、グルクロン酸誘導体やグルコサミン誘導体などを原料にして有機化学的手法によって中間体あるいは目的化合物を合成・修飾する方法や多糖を酸やアルカリなどを用いて分解して中間体あるいは目的化合物を得る方法などの有機化学的

手法、グルクロン酸や N- アセチルグルコサミンなどを原料にして転移酵素や分解酵素の逆反応などを利用して中間体あるいは目的化合物を合成・修飾する方法や多糖を酵素を用いて分解して中間体あるいは目的化合物を得る方法などの生化学的手法、あるいは、微生物や細胞に酵素の遺伝子を導入して原料、中間体あるいは目的化合物、または合成・修飾に用いる酵素を得るなどの遺伝子工学的手法などを、単独あるいは組み合わせて用いる方法をあげることができる。もちろん、本発明の化合物はその製造法によって限定されるものではなく、目的化合物が得られるのならばどのような方法を用いても差し支えない。

しかし、種々の製造法の中でも天然物、特に多糖やオリゴ糖など、を原料や中間体として用いて製造する方法が最も効率的な方法であり、好ましい。さらに、動物組織、あるいは、微生物の培養液から抽出および必要に応じて精製したヒアルロン酸およびその塩を原料として用い、ヒアルロン酸を解重合することによって得られた分解物を中間体あるいは目的化合物として用いる方法がより好ましい。解重合の方法としては、例えば、熱や超音波などを用いる物理的な方法、酸やアルカリなどを用いる化学的な方法、または、酵素などを用いる生化学的な方法などを単独、あるいは、組み合わせて用いる方法をあげることができる。それらの中でも、反応の特異性、効率、あるいは、安全性などの面から考えて、酵素を用いる方法が好ましい。用いる酵素はヒアルロン酸の解重合反応を触媒する活性をもつものであればよく、特に限定されず、それらを目的に応じて単独で、あるいは、複数を組み合わせて用いることができる。用いる酵素を具体的に例示すれば、動物組織由来の酵素、例えば、精巣型のヒアルロニダーゼ (EC 3. 2. 1. 35)、ヒルのヒアルロニダーゼ (EC 3. 2. 1. 36)、オコゼ毒液中のヒアルロニダーゼ (EC 3. 2. 1. 1)、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (EC 3. 2. 1. 31)、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (EC 3. 2. 1. 52) など、や微生物由来の酵素、例えば、*Streptomyces hyalurolyticus* 由来のヒアルロニダーゼ (EC 4. 2. 2. 1)、ヒアルロニダーゼ SD (EC 4. 2. 2. 2)、コンドロイチナーゼ ABC (EC 4. 2. 2. 4)、コンドロイチナーゼ AC I (EC 4. 2. 2. 5)、コンドロイチナーゼ AC II (EC 4. 2. 2. 5) など、をあげることができる。その中でも、安定した品質のものを安定的に供給できるなどの利点から、微生物由来の酵素が好ましく、その中でも *Streptomyces hyalurolyticus* 由来のものが特



に好ましい。

酵素反応はそれぞれの酵素の特性に応じて温度、pHなどの諸条件を設定して行えばよいが、以後の分画・精製や修飾を行うにあたって必要になる可能性が高い脱塩操作を省くために、実質的に塩を含まない状態、あるいは、不揮発性の塩および有機溶媒不溶の塩を実質的に含まない状態で反応が行われることが好ましい。ここでいう実質的に塩を含まない状態とは、酵素反応後に脱塩操作などをせずに以後の分画・精製、あるいは、修飾操作を容易に実施可能な量を超える量の塩を含まない状態であることを意味する。好ましくは反応液中の塩含量は目的化合物の10% (w/w) 以下、より好ましくは1% (w/w) 以下である。本発明でいう反応液中の塩とは、イオン強度やpHの調整などのために用いられる緩衝液の成分、例えば、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどを意味する。本発明でいう不揮発性の塩とは、酢酸アンモニウムや重炭酸アンモニウムなど、減圧操作などによって比較的容易に揮発する揮発性の塩以外の塩を意味する。揮発性の塩を用いれば、中間体や目的化合物の溶液から液成分を減圧などによって除去する操作を行うときに、同時に塩を除去することが可能となる。本発明でいう有機溶媒不溶の塩とは、酢酸アンモニウムや酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウムなどのように水にも有機溶媒、例えば、エタノール、メタノール、プロパノールなどにも溶ける塩以外の塩を意味する。有機溶媒可溶の塩を用いれば、有機溶媒可溶の塩が混在している水には可溶であるが有機溶媒には不溶である中間体や目的化合物を含む混合物を適切な有機溶媒で洗浄することによって、混在する塩を容易に分離することが可能となる。

得られた分解物は必要に応じて、常法、例えば、抽出、濃縮、ろ過、再結晶、再沈殿またはクロマトグラフ法などによって分離精製することができる。その中でも、その効率の良さからクロマトグラフ法、より好ましくはイオン交換クロマトグラフ法によって分離精製する工程を含むことが好ましく、担体として陰イオン交換体を用いることがさらに好ましい。クロマトグラフには回分式、循環式、移動床式、擬似移動床式などの方式があるが、場合に応じて最適なものを選択すればよい。クロマトグラフ法に用いる溶離液は、用いる方法に応じて最適な組成

のものを用いればよいが、以後の精製や修飾を行うにあたって必要になる可能性が高い脱塩操作を省くために、不揮発性の塩および有機溶媒不溶の塩を実質的に含まない溶離液を用いることが好ましい。ここでいう「不揮発性の塩および有機溶媒不溶の塩を実質的に含まない溶離液」とは、クロマトグラフ後に脱塩操作などをせずに以後の分画・精製、あるいは、修飾操作を容易に実施可能な量を超える量の不揮発性の塩および有機溶媒不溶性の塩を含まない溶離液であることを意味する。好ましくは溶離液中の各々の塩含量は0.5M以下、より好ましくは0.1M以下である。通常、イオン交換クロマトグラフ法に用いる溶離液はイオン強度やpHの調整などのために塩を含む。塩を含む溶離液を使用する場合、塩として実質上揮発性の塩のみを含む溶離液を用いることが好ましく、揮発性の塩としては、扱いの容易さ、安全性、入手の容易さ、価格などの点から考えてアンモニウム塩が好ましく、酢酸アンモニウムであることがさらに好ましい。または、塩として実質上有機溶媒可溶性の塩のみを含む溶離液を用いることが好ましく、有機溶媒可溶性の塩としては、扱いの容易さ、安全性、入手の容易さ、価格などの点から考えて酢酸塩が好ましく、酢酸アンモニウム、あるいは、酢酸ナトリウムであることがさらに好ましい。

得られた中間体は種々の方法、例えば、有機化学的手法や生化学的な手法など、あるいは、それらの組み合わせによって精製や修飾などを行って目的化合物とすることができる。

#### [本発明の化合物の投与方法、投与量および剤形]

本発明の化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物は、通常、全身的または局所的に、経口的または非経口的に投与される。投与量は、疾患の種類、症状の程度、投与対象の年齢や体重などの諸条件をもとに総合的に判断し、最適な量を適宜決定すべきであり、特に限定されない。しかし、通常、成人では1日当たり経口投与の場合0.01~100mg/kg、非経口投与の場合0.001~10mg/kgである。投与は必要に応じて1日1回ないし複数回に分けて行われる。

本発明の化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒

和物の投与は、固体組成物、液体組成物およびその他の組成物の経口投与、注射剤、外用剤、坐剤などの非経口投与のいずれの形態であってもよく、必要に応じて最適な方法が選択される。本発明の化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物の少なくともひとつを有効成分として含有する医薬組成物は、通常の製剤化に用いられる担体、賦形剤、その他の添加剤を用いて調製することができる。製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

- 10 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの活性物質（有効成分）が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合
- 15 される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸またはアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでもよい。錠剤または丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣や胃溶性または腸溶性物質のフィルムで
- 20 被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

- 経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでもよい。この組成物は、不活性な希釈
- 25 剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水および注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、ブ

非経口投与のためのその他の医薬組成物としては本発明の化合物の少なくともひとつを有効成分として含み、常法によって処方される外用液剤、軟膏剤、塗布剤、坐剤、経皮剤、点眼剤などが含まれる。

本発明の高分子とは、本発明の化合物を側鎖構造として有する高分子化合物のことであり、抗血栓性を有する高分子材料として使用できる。本発明の高分子の製造に用いる主鎖となるポリマーは生体適合性ポリマーであることが好ましく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、シリコン、ポリメチルメタクリレート、ポリ四フッ化エチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリスルホン、ABS樹脂、ポリアセタールおよびこれらの誘導体を挙げることができる。主鎖と側鎖の間には適当なスペーサを入れることもでき、これによって抗血栓性を有する側鎖に柔軟性を付与することができる。また、本発明の化合物を側鎖構造に有する複数の高分子化合物のブロックコポリマーであってもよい。さらには、本発明の化合物に加えて、ヘパリンなどの血栓形成抑制物質やウロキナーゼなどの血栓溶解酵素などの抗血栓作用を有する物質を併せて結合してもよい。

当然のことながら、本発明の高分子は製造法によって限定されるものではなく、目的とするものが得られるのであれば、どのような方法を用いても差し支えない。本発明の高分子を得るには種々の方法があり、それらの方法を単独あるいは組み

合わせて用いることができる。これらの製造法は当業者に公知である。例えば、主鎖となるポリマーのモノマーに本発明の化合物を結合した後、重合反応を行い主鎖ポリマーを形成してもよく、あるいは主鎖ポリマーに本発明の化合物を結合してもよい。

- 5      本発明の化合物はグルクロン酸誘導体やグルコサミン誘導体といった生体成分の誘導体をその構造中にもつことからわかるように生体適合性が高く、生体に悪影響を及ぼすことが少なく、仮に高分子より本発明の化合物が脱落したとしても生体に悪影響を及ぼすことが少ない。

10      [本発明のコーティング剤、成型物およびその製造法]

本発明はさらに、本発明の化合物の少なくともひとつを有効成分とするコーティング剤および本発明の高分子の少なくともひとつを有効成分とするコーティング剤を提供する。このようなコーティング剤は本発明の化合物または高分子を適当な溶媒に溶解、分散し、人工臓器や医療用具などに塗布、含浸、スプレーコーティングなどの方法によりコーティングすることができる。

- 15      本発明の成型物は、本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。したがって、材料のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。本発明の成型物を得るには、化合物や高分子を別に製造した成型物にコーティングする方法、化合物を別に製造した成型物と結合させる方法、化合物や高分子を含む材料から直接成型する方法など、種々の方法があり、それらの方法を単独あるいは組み合わせて用いることができる。
- 20      本発明の成型物は、優れた抗血栓性を有するため、人工臓器、医療用具の部品あるいはそれ自体として用いることができる。成型物の形状は用いる材料の性質

- 25      にもよるが、その使用目的に応じて、フィルム状物、膜状物、管状物、板状物、網状物、繊維状物、布状物などのいずれかの形状にすることができる。

[本発明の人工臓器およびその製造法]

本発明の人工臓器は、本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつ

とつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。また、このようにして製造された人工臓器あるいはその他の方法で製造された従来型の人工臓器に、さらに本発明のコーティング剤を塗布して製造することもできる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

本発明の人工臓器の例としては、人工血管、人工心臓、心臓ペースメーカー、人工心臓弁、人工腎臓、人工肺、人工心臓、人工脾臓、人工骨、人工関節、人工靱帯などをあげることができる。

10

〔本発明の医療用具およびその製造法〕

本発明の医療用具は、本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

15

本発明の医療用具の例としては、注射筒、注射針、透析用留置針、留置針、輸液セット、輸液・血液用フィルター、血液バッグ、チューブ・カテーテル（栄養用、胃・食道用、胆管用、呼吸器用、泌尿器用、血管用、心臓用、吸引・注入・排水用など）、血液透析器ハウジング、血液透析器中空糸、血液透析膜、体外循環血液回路、外シャント、人工肺膜、創傷被覆材、ステントなどをあげることができる。

20

〔本発明の細胞培養用組成物〕

本発明の細胞培養用組成物は従来の細胞培養用組成物に本発明の化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を添加して製造することができる。本発明または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を添加する細胞培養用培地には、例えば199培地、MEM（イーグルの最小必須培地）、BME（イーグルの基本培地）、DMEM（ダルベッコ変法

25

イーグル培地)、RPMI1640、Ham's F12培地、MCDB104、MCDB153を含むがこれに限定されない。本発明の細胞培養用組成物を用いて培養することのできる細胞には、魚類細胞、両生類細胞、鳥類細胞、哺乳動物細胞などの脊椎動物の細胞を含むが、これに限定されない。本発明の化合物は顕著な血管内皮細胞増殖促進作用および血管新生促進作用を有することから、本発明の細胞培養用組成物は哺乳動物細胞、特に血管内皮細胞の培養時に用いて、試験研究用の培養に利用できることはもちろんのこと、細胞成長因子（例えば、VEGF）のような有用物質の生産に用いたり、火傷の治療用の人工培養皮膚のような治療用組織の製造にも利用することができる。

10

#### [本発明の細胞培養用器材]

本発明の細胞培養用器材は、本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。また、このようにして製造された細胞培養用器材あるいはその他の方法で製造された従来型の細胞培養用器材に、さらに本発明のコーティング剤を塗布して製造することもできる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

本発明の細胞培養用器材の例としては、シャーレ、フラスコ、マイクロプレート、ボトルなどをあげることができる。

20

#### [本発明の化合物の化合物および高分子の血小板凝集抑制作用、血小板粘着抑制作用]

本発明の化合物（化合物例1、2、3、4、6、8、10）の血小板凝集抑制作用を、ウサギ多血小板血漿を用いて、Born, O'Brienの方法（Born, G., V., R.: Nature (London), 194, 924 (1962)., O'Brien, J., R.: J. Clin. Pathol., 15, 556 (1962).）に準じて測定した。比較対照として抗血小板剤である塩酸チクロピジンについても同様の試験を行った。その結果、本発明の化合物はいずれも低濃度で顕著な血小板凝集抑制作用を示した。

25

また、本発明の化合物を側鎖構造として有する高分子化合物（高分子例 2 ～ 4）の血小板粘着抑制作用を、ウサギ多血小板血漿を用いて、ミクロスフィアカラム法（Kataoka, K., Maeda, M., Nishimura, T., Nitadori, Y., Tsuruta, T., Akaike, T., Sakurai, Y. :J. Biomed. Mater. Res., 14, 817(1980).）により評価した。

5 その結果、本発明の高分子は顕著な血小板粘着抑制作用を示した。

さらに、本発明の化合物をポリエチレンイミン活性化ポリエチレン管と反応させて得られる本発明の化合物を固定した成型物の血小板粘着率を測定したところ、本発明の化合物を固定しない未処理管に比べて血小板粘着が全く検出されず、優れた抗血栓性を示すことが明らかとなった。

10

[本発明の化合物および高分子の血管内皮細胞増殖促進作用]

本発明の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用をウシ大動脈内皮細胞を用いて測定した。その結果、試験に用いた本発明の化合物はいずれも低濃度で優れた増殖促進作用を示した。また、本発明の化合物は、血管内皮細胞に特異的に作用し、血管内皮細胞の増殖を促進するサイトカインとして知られる血管内皮細胞成長因子（VEGF）と相乗的に作用し、より優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。これは、本発明の化合物が生体由来の内因性および治療目的で投与あるいは誘導された外因性の VEGF と相乗的に作用することによって、より優れた血管内皮細胞増殖促進作用を発現することを示すものである。

15

本発明で使用する前記高分子をコーティングしたマイクロプレートでウシ大動脈内皮細胞を培養し、血管内皮細胞増殖促進作用を測定した。その結果、本発明の高分子（本発明の成型物）はいずれも優れた増殖促進作用を示した。

20

[本発明の化合物の血管新生促進作用]

本発明の化合物の血管新生促進作用をウシ大動脈内皮細胞を用いて測定した。その結果、本発明の化合物はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

25

#### 発明の効果

本発明の一般式（1）の化合物およびその薬理学的に許容される塩および溶媒



和物または塩の溶媒和物は、優れた血小板粘着凝集抑制作用を有し、この作用に基づく治療薬、すなわち、抗血小板剤として有用である。具体的には、血栓症の進展阻止、再発防止、血栓症の危険因子を有する患者の血栓症の二次防止、健康人の血栓症の一次防止を目的とした治療に用いることができる。さらに、具体的

5 には、循環器疾患（急性心筋梗塞、不安定狭心症、慢性安定型狭心症、陳旧性心筋梗塞、心房細動による血栓塞栓症、汎発性血管内血液凝固症候群（DIC）、冠動脈バイパス術後のグラフト閉塞、経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の冠動脈の狭窄および閉塞、人工心臓弁置換術後の血栓性合併症（血栓性閉塞症、血栓弁）、肺血栓・閉塞症、体外循環血液中の血小板活性化）、脳血管障害（一過性脳虚血発作（TIA）、脳梗塞）、末梢動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、血行再建術後の閉塞）、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、その他の血栓症など（本態性血小板症、血栓性血小板減少性紫斑病（TPP）、溶血性尿毒症症候群、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、子癇、ベーチェット病）の治療および予防に対して有効である。また、本発明はこのような優れた化合物を製造するうえで有用

10 製造法を提供するものである。

また、本発明の一般式（1）の化合物、特に式（16）の化合物およびその薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物は、優れた血管内皮細胞増殖促進作用と優れた血管新生促進作用を有し、これらの作用に基づく治療薬として有用である。具体的には、血管内皮再生療法あるいは血管新生療法に用いる

20 治療薬および予防薬（血管内皮細胞増殖促進剤、血管新生促進剤）として有用である。さらに具体的には、循環器疾患（急性心筋梗塞、不安定狭心症、慢性安定型狭心症、陳旧性心筋梗塞、心房細動による血栓塞栓症、汎発性血管内血液凝固症候群（DIC）、冠動脈バイパス術後のグラフト閉塞、経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の冠動脈の狭窄および閉塞、人工心臓弁置換術後の血栓性合併症（血栓性閉塞症、血栓弁）、肺血栓・閉塞症、脳血管障害（一過性脳虚血発作（TIA）、脳梗塞）、末梢動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、血行再建術後の閉塞）、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、その他の血栓症など（本態性血小板症、血栓性血小板減少性紫斑病（TPP）、溶血性尿毒症症候群、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、子癇、ベーチェット病）の治療および予防、創傷（褥瘡など

25

を含む慢性皮膚潰瘍、糖尿病性潰瘍、火傷、角膜創傷、化学療法・放射線療法を受けた癌患者の口腔粘膜炎、皮膚移植などの各種手術後の創傷、胃腸組織の損傷など）の治療に対して有効である。

5 本発明の化合物および高分子は優れた抗血栓性を有するため、抗血栓性を必要とする成型物をつくるための材料あるいはコーティング剤として有用である。

本発明の化合物、高分子および成型物は優れた抗血栓性を有するため、抗血栓性を必要とする人工臓器、医療用具の部品あるいはそれ自体として有用である。具体的には、人工血管、人工心臓、心臓ペースメーカー、人工心臓弁、人工腎臓、人工肺、人工心肺、人工脾臓、人工骨、人工関節、人工靱帯などの人工臓器、注射筒、注射針、透析用留置針、留置針、輸液セット、輸液・血液用フィルター、血液バッグ、チューブ・カテーテル（栄養用、胃・食道用、胆管用、呼吸器用、泌尿器用、血管用、心臓用、吸引・注入・排液用など）、血液透析器ハウジング、血液透析器中空糸、血液透析膜、体外循環血液回路、外シャント、人工肺膜、創傷被覆材、ステントなどの医療用具の材料や部品として有用である。

15 さらに、本発明の化合物およびこれを側鎖構造として有する高分子は優れた血管内皮細胞増殖促進作用を有し、血管内皮細胞の被覆を促進するため、抗血栓性を必要とする成型物をつくるための材料あるいはコーティング剤として有用である。また、これらの化合物、高分子および成型物は優れた血管内皮細胞増殖促進作用を有し、血管内皮細胞の被覆を促進するため、抗血栓性を必要とする人工臓器、医療用具の部品あるいはそれ自体として有用である。

さらに、本発明の化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子は細胞培養用組成物の成分として有用であり、本発明の化合物およびこれを側鎖構造として有する高分子は細胞培養用器材としての利用が期待できる。

25

#### 実施例

以下の実施例において、化合物製造例、高分子製造例、成型物製造例、抗血栓作用試験および製剤製造例、をあげて本発明をさら詳しく説明する。なお、当然のことではあるが、本発明は以下の実施例に記載された物質、処方および方法に

限定されるものではなく、特許の請求の範囲に含まれるすべての物質、処方および方法を含むものである。

#### 実施例 1 : 化合物製造例 1

4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセ  
 5 トアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピ  
 ランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノ  
 ース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc (化合物例 1) ]、4-  
 デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセト  
 アミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピラ  
 10 ンウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシ  
 ル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 -  
 デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3  
 GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc (化合物例 2) ]、4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレ  
 オ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  
 15  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-  
 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グ  
 ルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコ  
 ピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトア  
 ミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4G  
 20 lcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc (化  
 合物例 3) ] および 4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル -  
 (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  
 $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D-  
 - グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- ア  
 25 セトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコ  
 ピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラ  
 ノシル -(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル -(1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド -  
 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$   
 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA

ヒアルロン酸ナトリウム（紀文フードケミファ製；商品名「ヒアルロン酸 FC H」）30 g を蒸留水 3 L に溶解し、40℃となるように加温した。0.1M 水酸化ナトリウム水溶液で溶液の pH を 6.0 に調整した後、*Streptomyces hyalurolyticus*

5 由来のヒアルロニダーゼ（天野製薬製；商品名「ヒアルロニダーゼ“アマノ”」）をヒアルロン酸ナトリウム 1 mg あたり 0.5 濁度減少単位となるように添加し、40℃で100時間反応を行った。反応後、公称分画分子量10kの親水性ポリエーテルスルホン製の限外ろ過（ミリポア製）によって溶液中から酵素を除去した。凍結乾燥することによって溶媒を除去し、分解物（27.4 g）を得た。

10 分解物を陰イオン交換クロマトグラフ法（カラム：YMC-Pack IEC-AX，溶離液：A;水, B;0.4M NaCl;リニアグラジェント（30分），検出:UV(232nm)）によって分画し（化合物例 1、2、3、4 の順に溶出）、化合物例 1～4 を含む画分を得た。各画分をゲルろ過法（担体：セファデックス G-10，溶離液：水）によって脱塩後、凍結乾燥して化合物 1～4（白色粉末）を得た。収量は、それぞれ、  
15 化合物例 1:1.7g, 化合物例 2:5.9g, 化合物例 3:3.4g, 化合物例 4:2.2g であった。各化合物はナトリウム塩として得られた。

化合物例 1～4は下記式 (20) で表される化合物である。式 (20) において、 $n$  は 1～4 の整数を示し、 $n$  が 1 のとき化合物例 1、 $n$  が 2 のとき化合物例 2、 $n$  が 3 のとき化合物例 3、 $n$  が 4 のとき化合物例 4 を示す。

$$\text{COONa} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{O} \end{array} \left[ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{COONa} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{O} \end{array} \right]_n \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{OH}$$

20 高速液体クロマトグラフ法（カラム:TSKgel DEAE-5PW, 溶離液: A;水, B;0.3M NaCl;リニアグラジェント（20分）, 検出:UV(232nm);面積百分率法）によって測定した各化合物の純度は97%以上であった。化合物例1～4の各々のウロ

ン酸含量をグルクロノラクトンを標準品として Bitter と Muir の方法 (Bitter, T., Muir, H.: Anal. Biochem., 4, 330 (1962).) によって、ヘキソサミン含量を 3 N 塩酸中 100℃ で 16 時間加水分解後、グルコサミン塩酸塩を標準品として Boas の方法 (ただし、樹脂処理なし; Boas, N., F.: J. Biol. Chem., 204, 553 (1953).) によって分析したところ、各化合物例の分析値はほぼ理論値通りであった。

#### 実施例 2 : 化合物製造例 2

4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3) -O- 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4) -3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3) -O- 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc (化合物例 1) ]、4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3) -O- 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4) -3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3) -O- 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4) -3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3) -O- 2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノース [  $\Delta$  HexA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3GlcNAc (化合物例 2) ] の製造

ヒアルロン酸ナトリウム (紀文フードケミファ製; 商品名「ヒアルロン酸 FC H」) 60 g を蒸留水 3 L に溶解し、40℃ となるように加温した。0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で溶液の pH を 6.0 に調整した後、*Streptomyces hyalurolyticus* 由来のヒアルロニダーゼ (天野製薬製; 商品名「ヒアルロニダーゼ “アマノ”」) をヒアルロン酸ナトリウム 1 mg あたり 1 濁度減少単位となるように添加し、40℃ で 100 時間反応を行った。反応後、公称分画分子量 10 k の親水性ポリエーテルスルホン製の限外ろ過 (ミリポア製) によって溶液中から酵素を除去した。凍結乾燥することによって溶媒を除去し、分解物 (53.7 g) を得た。

分解物を陰イオン交換クロマトグラフ法 (カラム: TSKgel DEAE-5PW, 分離液: A; 水, B; 0.5 M 酢酸ナトリウム水溶液; リニアグラジェント (A/B (90/10)  $\rightarrow$  A/B (60/40); 40 分), 検出: UV (232 nm)) によって分画し (化合物例 1、2 の順に溶出)、化合物例 1 および 2 を含む画分を得た。各画分から凍結乾燥すること

によって水を除去した。凍結乾燥した各画分をエタノールで洗浄して塩を除去し、再度水に溶解した後に凍結乾燥して化合物例 1、2（白色粉末）を得た。収量は、それぞれ、化合物例 1:18.1g, 化合物例 2:29.5g であった。各化合物はナトリウム塩として得られた。

- 5 高速液体クロマトグラフ法（カラム:TSKgel Amide-80, 溶離液:アセトニトリル/水/酢酸/トリエチルアミン(65/35/2/1, v/v), 流速:1.0mL/分, カラム温度:80℃, 検出:UV(232nm);面積百分率法)によって測定した各化合物の純度は97%以上であった。ウロン酸含量とヘキサミン含量を実施例 1 に示した方法によって分析したところ、値はほぼ理論値通りであった。

10

### 実施例 3 : 化合物製造例 3

- 4-デオキシ- $\alpha$ -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラニ  
 15 トール [ $\Delta$  HexA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc<sub>OH</sub> (化合物例 5)]、  
 4-デオキシ- $\alpha$ -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-  
 20 -デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラニトール [ $\Delta$  HexA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc<sub>OH</sub> (化合物例 6)] の製造

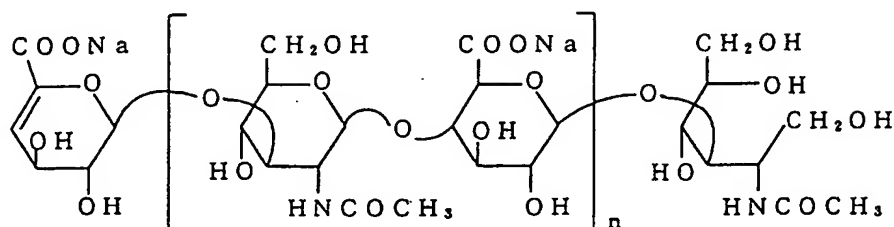
- 50mg の化合物例 1 を 50mL の 3 mg/mL 水素化ホウ素ナトリウム水溶液に溶解し、室温で 1 時間処理した。5 mL の 6 M 酢酸を加えて反応を停止し、50mL のメタノールを加えた後、エバポレーターを用いて乾固した。さらに、50mL の  
 25 メタノールの添加および乾固を 2 回繰り返した。乾固によって残った固形物を 5 mL の水に溶解し、実施例 1 と同様にゲルろ過法によって脱塩後、凍結乾燥して化合物例 5（白色粉末; 44.7mg）を得た。

同様の方法で化合物例 2 を原料として用いて化合物例 6 を得た。

化合物例 5 および化合物例 6 は式 (21) で表される化合物である。式 (21) に

において、 $n$ は1～2の整数を示し、 $n$ が1のとき化合物5を、2のとき化合物6を示す。

式(21)



化合物5および6の純度を実施例2に示した方法によって測定したところ、98%以上であった。ウロン酸含量とヘキサミン含量を実施例1に示した方法によって分析したところ、分析値はほぼ理論値通りであった。

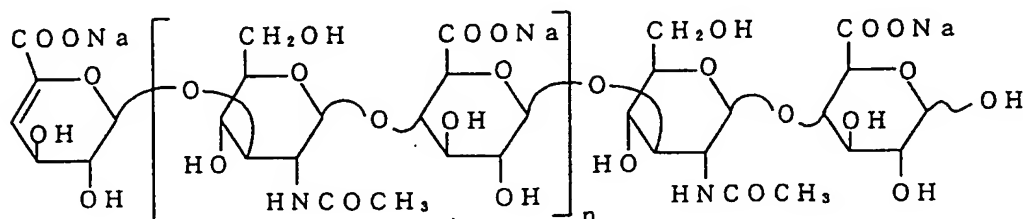
#### 実施例4：化合物製造例4

4-デオキシ- $\alpha$ -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロン酸 [ $\Delta$  HexA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcA (化合物例7)]、4-デオキシ- $\alpha$ -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O- $\beta$ -D-グルコピランウロン酸 [ $\Delta$  HexA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcA  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcA (化合物例8)の製造

化合物例1をReissigらの方法(Reissig, J., L., Strominger, J. L., Leloir, L., F.: J. Biol. Chem., 217, 959(1953).)に準じてpH9のホウ酸緩衝液中で加熱した。反応液中のホウ酸を実施例3と同様にホウ酸メチルとして除去し、実施例1と同様にゲルろ過法によって脱塩後、凍結乾燥して化合物例7(白色粉末)を得た。50mgの化合物例1を原料としたとき、43.1mgの化合物例7を得た。

同様に、50mgの化合物例2を原料としたとき、44.8mgの化合物例8(白色粉末)を得た。

式 (22)



### 实施例 5：化合物製造例 5

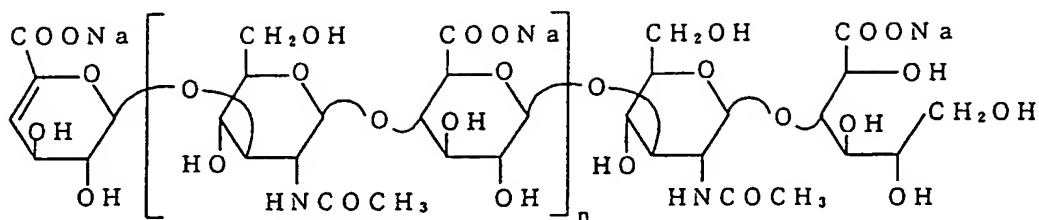
同様に、20mg の化合物例 8 を原料としたとき、17.8mg の化合物例 10（白  
20 色粉末）を得た。

化合物例 9 および化合物 10 は式 (23) で表される化合物である。式 (23) に  
 おいて、 $n$  は 0 ~ 1 の整数を示し、 $n$  が 0 のとき化合物 9 を、1 のとき化合物 1



0を示す。

式 (23)



化合物 9 および 10 の純度を実施例 2 に示した方法によって測定したところ、98%以上であった。ウロン酸含量とヘキサミン含量を実施例 1 に示した方法によって分析したところ、分析値はほぼ理論値通りであった。

#### 5 実施例 6 : 高分子化合物製造例

- ポリ (N-p- ビニルベンジル - [O-4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコンアミド] ) (高分子例 1)、ポリ (N-p- ビニルベン
- 10 ジル - [O-4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコンアミド] ) (高分子例 2)、ポリ (N-p-
- 15 ビニルベンジル - [O-4- デオキシ -  $\alpha$  -L- スレオ - ヘキサ -4- エンピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコピラノシル - (1 $\rightarrow$ 4)-3-O-  $\beta$  -D- グルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコ
- 20 ルコピランウロノシル - (1 $\rightarrow$ 3)-O-2- アセトアミド - 2 - デオキシ -  $\beta$  -D- グルコ

5

10

25

32

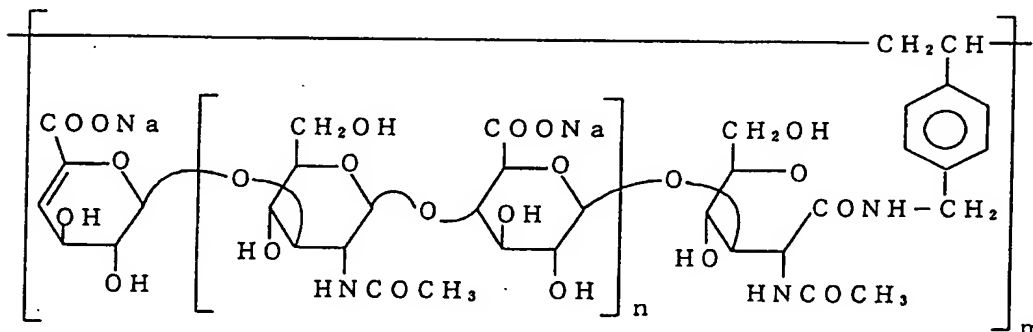
行った。重合後、液をメタノール中に注入して、重合体を析出させた。メタノールをデカンテーションで除き、重合体を分離した。重合体を水に溶解し、メタノールから析出させる再沈殿法によって重合体を精製して高分子例 1 (1.4 g) を得た。

- 5 同様の方法で化合物例 2 を原料として用いて高分子例 2 を、化合物例 3 を原料として用いて高分子例 3 を、化合物例 4 を原料として用いて高分子例 4 を得た。

高分子例 1 ~ 4 は下記式 (24) で表される化合物である。式 (24) において、 $n$  は 1 ~ 4 の整数を示し、 $n$  が 1 のとき高分子例 1、2 のとき高分子例 2、3 のとき高分子例 3、4 のとき高分子例 4 を示す。

- 10 光散乱法によって高分子例 1 ~ 4 の重量平均分子量を測定したところ、約 4 万であった。

式 (24)



#### 実施例 7 : 成型物製造例

化合物例 1 ~ 4 固定ポリエチレン管 (成型物例 1 ~ 4) の製造

- 15 Larm ら (Larm, O., Lasson, R., Olsson, P.: Biomat. Med. Dev. Art. Org., 11, 161 (1983).) の方法に準じて製造を行った。化合物例 1 とポリエチレンイミン活性化ポリエチレン管 (1.8mmID × 100cmL) を 0.15M NaCl 中、 $\text{NaB}(\text{CN})\text{H}_3$  と pH3.5, 50℃ で 2 時間反応させて化合物例 1 固定ポリエチレン管 (成型物例 1) を得た。

- 20 同様の方法で、化合物例 2 を原料として成型物例 2、化合物例 3 を原料として成型物例 3、化合物例 4 を原料として成型物例 4 を得た。

## 実施例 8 : 本発明の化合物の血小板凝集抑制作用

- ウサギ大動脈から、3.8%クエン酸ナトリウム水溶液 1 容に対して血液 9 容となるように採血し、直ちに遠心分離 (50×g, 10分, 室温) して上清として多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を得た。PRP 100  $\mu$  L に各濃度の本発明化合物 1 ~ 7 の溶液 10  $\mu$  L を加えて 37℃ で 1 分間保持後、凝集惹起剤として 10  $\mu$  L の 10  $\mu$  g/mL コラーゲン (ウシ腱コラーゲン; 明治薬品製) を加え、添加後 7 分間凝集曲線を記録した。血小板凝集能の測定は、血小板凝集計 (製造: エム・シー・メディカル) を使用して Born, O'Brien の方法 (Born, G., V., R.: Nature (London), 194, 924 (1962)., O'Brien, J., R.: J. Clin. Pathol., 15, 556 (1962).) に準じて行った。比較対照として、代表的な抗血小板剤である塩酸チクロピジンについても試験を行った。結果を表 1 に示す。

【表 1】

表 1

試験化合物	50%阻害濃度 ( $\mu$ M)
化合物例 1	2.7
化合物例 2	0.0032
化合物例 3	0.0052
化合物例 4	0.0044
化合物例 6	0.0027
化合物例 8	0.0038
化合物例 10	0.0035
塩酸チクロピジン	427

表 1 に示したように、本発明の化合物は優れた血小板凝集抑制作用を示した。

## 実施例 9 : 本発明の化合物の急性毒性

- 本発明化合物の代表例 (化合物例 1 - 10) について、ラット (体重 300 ~ 400 g, Wistar 系, オス) を用いて急性毒性試験を行ってところ、LD<sub>50</sub> は 500 mg/kg 以上であった。

## 実施例 10 : 本発明の高分子の血小板粘着抑制作用

- 高分子例 2 ~ 4 の血小板粘着抑制作用をミクロスフィアカラム法 (Kataoka, K., Maeda, M., Nishimura, T., Nitadori, Y., Tsuruta, T., Akaike, T., Sakurai,

Y. :J. Biomed. Mater. Res. , 14, 817(1980).) により評価した。実施例 8 と同様に  
 して得た PRP を 1200G, 7 分間, 2 回遠心分離によって Dulbecco PBS で洗浄  
 し、終濃度  $1 \times 10^5$  platelets/ $\mu$  L の血小板懸濁液を調製した。ミクロスフィア  
 カラム (テフロンカラム (3 IDmm  $\times$  50mmL) にポリスチレンビーズ (直径 15  
 5 0  $\mu$  m, 20% ジビニルベンゼン架橋, 非多孔質) を封入) に各濃度の高分子水溶  
 液を注入し、吸着後蒸留水で十分にリンスした。このカラムに血小板懸濁液を通  
 液した (流速 0.5 mL/分, 室温)。通液後の液中の血小板濃度を測定し、血小板  
 粘着率を算出した。結果を表 2 ~ 4 に示す。

【表 2】

表 2 高分子例 2

濃度 (%)	血小板粘着率 (%)
0	99.7
0.001	90.2
0.00125	63.9
0.0025	28.4
0.005	0
0.01	0
0.02	0

【表 3】

表 3 高分子例 3

濃度 (%)	血小板粘着率 (%)
0	99.6
0.001	91.5
0.00125	62.9
0.0025	29.0
0.005	0
0.01	0
0.02	0

【表 4】

表 4 高分子例 4	
濃度 (%)	血小板粘着率 (%)
0	99.8
0.001	90.2
0.00125	60.8
0.0025	27.3
0.005	0
0.01	0
0.02	0

表 2～4 に示したように、本発明の化合物は優れた血小板粘着抑制作用を示した。

実施例 11：本発明の成型物の抗血栓性

- 5 成型物例 2～4 の抗血栓性を評価した。実施例 10 と同様の方法で終濃度  $1 \times 10^5$  platelets/ $\mu$  L の血小板懸濁液を調製した。成型物例 2～4 および未処理のポリエチレン管（未処理管）に血小板懸濁液を循環通液した（流速 0.5 mL/分，1 時間，室温）。

- 10 通過後の液中の血小板数濃度を測定し、未処理管および成型物例 2～4 の血小板粘着率を算出した。結果を表 5 に示す。

【表 5】

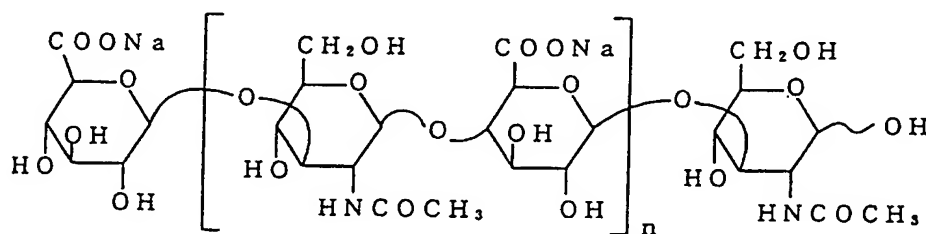
表 5	
試験成型物	血小板粘着率 (%)
未処理管	98.1
成型物例 2	0
成型物例 3	0
成型物例 4	0

表 5 に示したように、成型物 2～4 は未処理管よりも明らかに血小板粘着率が低かった。この結果は、本発明の成型物が優れた抗血栓性をもつことを示すものである。

- 15 実施例 12：本発明の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用 1

- 試験には、細胞としてウシ大動脈血管内皮細胞（継代数 3）、培地として 10% FCS（ウシ胎児血清）、100 units / mL ペニシリン G、100  $\mu$ g / mL ストレプトマイシンを含む MEM を用いた。96 ウェルのマイクロプレートに細胞を  $4 \times 10^3$  個 / ウェル ( $4 \times 10^4$  / mL; 100  $\mu$ L) となるように播種し、既定の終濃度 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ g / mL) となるように式 (1) の化合物（化合物例 1 ~ 10）（10  $\mu$ L; 培地に溶解）を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 20 時間培養した後、化合物の血管内皮細胞増殖に対する作用（指標として、5-ブromoデオキシウリジン (BrdU) の取り込み量を採用）を「細胞増殖 ELISA, BrdU 発色キット」（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて測定した。
- 比較例として、比較化合物 1 および 2 についても同様に試験を行った。比較化合物は下記の式 (25) で示される化合物である。式 (25) において、n は 1 または 2 の整数を示し、1 のとき比較化合物 1（表中、比較 1）、2 のとき比較化合物 2（表中、比較 2）を示す。比較化合物 1 および 2 は、実施例 2 に準じて調製した。ただし、ヒアルロニダーゼにはウシ睾丸由来のものを用い、検出は 206nm にて行った。化合物の純度は 97% 以上であり、ウロン酸含量とヘキサミン含量はほぼ理論値とおりであった。

式 (25)



次の式を用いて、各化合物の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

$$\text{促進率 (\%)} = \frac{\text{(各化合物添加試験の BrdU 取り込みの増加量)}}{\text{(対照試験の BrdU 取り込みの増加量)}} \times 100$$

- 得られた結果を表 6 に示した。

【表 6】

化合物	表 6					
	促進率 (%)					
	化合物濃度 (μg/mL)					
	0	0.1	0.5	1	5	10
1	100.0	110.2	149.2	198.2	188.2	146.9
2	100.0	105.2	142.5	188.1	179.2	148.0
3	100.0	107.2	139.9	179.2	175.8	136.6
4	100.0	102.1	147.0	180.3	177.7	147.4
5	100.0	101.1	144.2	182.7	169.9	141.1
6	100.0	100.5	143.8	167.9	168.8	142.2
7	100.0	104.8	139.7	172.6	170.0	129.7
8	100.0	103.3	140.9	181.1	168.7	141.3
9	100.0	102.8	139.5	180.3	179.3	133.4
10	100.0	101.1	138.8	178.3	170.0	135.8
比較 1	100.0	100.2	98.8	111.7	100.2	101.5
比較 2	100.0	99.5	101.1	107.3	102.0	99.2

表 6 に示したように、化合物例 1 ～ 10 はいずれも優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

#### 実施例 13：本発明の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用 2

- 5 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) との相互作用を検討するために試験を行った。VEGF にはヒト組換え型のもの (血管内皮細胞成長因子、ヒト、組換え体、生化学用：和光純薬製) を用いた。

- 10 試験は実施例 12 と同様に行ったが、化合物添加と同時に VEGF (終濃度 10 ng/mL) を添加した。比較試験として、VEGF 単独添加試験 (VEGF のみ添加の試験) および陰性対照試験 (化合物も VEGF も無添加の試験) も行った。血管内皮細胞増殖に対する作用は実施例 12 と同様に測定した。

次の式を用いて、各化合物の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

$$\text{促進率 (\%)} = (\text{各化合物添加試験の BrdU 取り込みの増加量}) \div (\text{陰性対照試験の BrdU 取り込みの増加量}) \times 100$$



得られた結果を表 7 に示した。

【表 7】

化合物	表 7					
	促進率 (%)					
	化合物濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	0	0.1	0.5	1	5	10
1	148.5	169.8	211.2	258.3	250.2	206.8
2	148.5	166.2	200.6	249.5	244.0	207.8
5	148.5	160.9	205.0	243.8	231.1	200.4
6	148.5	159.8	205.2	232.2	224.8	205.7
7	148.5	165.0	206.2	235.9	228.7	191.3
8	148.5	168.7	202.9	251.2	224.9	199.2
9	148.5	159.8	200.2	245.6	244.2	196.8
10	148.5	165.2	199.9	243.3	228.7	194.0

なお、表 7 において、化合物濃度 0 の欄に示す促進率は、VEGF を単独添加した場合の促進率を示す。本発明の化合物の単独添加試験の結果を示す表 6 および表 7 の結果から、試験した化合物はいずれも VEGF と相乗的に作用し、優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

#### 実施例 14：本発明の化合物の血管新生促進作用 1

氷水浴中で冷却しながら  $\text{NaHCO}_3$  不含の 10 倍濃縮 MEM 1 容量に対して再構成緩衝液 (500mM NaOH, 260mM  $\text{NaHCO}_3$ , 200mM HEPES) 1 容量を混合した後、0.3% コラーゲン塩酸溶液 (pH3.0) 8 容量を加えてよく混和し、コラーゲン溶液とした。24 ウェルのマイクロプレートにコラーゲン溶液 0.5mL を分注し、37℃、30 分間保温してゲルを固めた。コラーゲンゲル上にウシ大動脈血管内皮細胞 (継代数 3~8) を  $5 \times 10^4$  個/ウェルで播種し、37℃ で約 3 時間培養して細胞を接着させた。その後、培地を取り除き、コラーゲン溶液 0.5mL を重層して 37℃、30 分間保温してゲルを固めた後、各濃度の化合物例 1~4 を含む 1 mL/ウェルの 2% FBS-MEM 培地を加えて 37℃ で 3 日間  $\text{CO}_2$  インキュー

- ター内で培養した。3日間培養後、形成された血管様の管腔（新生血管）を位相差顕微鏡下、倍率100倍で撮影した。写真をトレースし、マイクロコンピュータイメージングデバイス（ニューロサイエンス社製）を用いて画像解析を行い、単位面積当たりの血管様管腔の長さを測定した。対照試験として、化合物を含まない培地で培養したものについて同様に血管様管腔の長さを測定した。

次の式を用いて、各化合物のもつ血管新生促進作用を評価した。

$$\text{促進率 (\%)} = \{ (\text{各試験の管腔長}) - (\text{対照試験の管腔長}) \} \div (\text{対照試験の管腔長}) \times 100$$

- 10 得られた結果を表8に示す。

【表8】

化合物	表 8					
	促進率 (%)					
	化合物濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	0	0.1	0.3	1	3	10
1	100.0	212.1	236.4	350.1	430.3	329.7
2	100.0	181.8	244.9	334.2	393.9	345.5
3	100.0	212.1	315.2	327.3	351.5	278.8
4	100.0	224.2	321.2	369.9	406.1	357.6

表8に示すように、化合物1～4はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

#### 実施例15：本発明の化合物の血管新生促進作用2

- 化合物例1および2の血管新生促進作用をラットを用いたディフュージョンチャンバー法によって評価した。すなわち、ディフュージョンチャンバー（膜孔径  $0.45 \mu\text{m}$ ; ミリポア社製）を組み立て、各濃度（0,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M）の化合物1および2の生理食塩液溶液  $200 \mu\text{L}$  を封入した。

- Wistar系ラット（オス；体重200-250g）にペントバルビタールを腹腔内投与（ $10\text{mg}/\text{匹}$ ）して麻酔した後、背部を刈毛して希ヨードチンキで消毒した。筋肉を傷つけないように皮膚を切開し、上記の液封入済みディフュージョンチャンバー皮下と筋膜との間に移植した。切開部を縫合し、1週間飼育後、麻酔したラ

ットの背部を切開しチャンバーを露出させ、血管新生の様子を観察後、チャンバーを筋肉ごと切除してホルマリンで固定した。

結果を表 4 に示した。表中、+、±、- はそれぞれ新生血管誘導が陽性、擬陽性、陰性であったことを示す。

【表 9】

表 9					
化合物	誘導能				
	化合物濃度 (M)				
	0	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
1	-	-	±	+	+
2	-	-	-	+	+

- 5 表に示すように、化合物例 1 および 2 はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

実施例 16：高分子化合物から製造される成型物の血管内皮細胞増殖促進作用

- 10 高分子例 1～4 の 0.01w/v% 水溶液をそれぞれ調製し、96 ウェルのポリスチレン製マイクロプレートに 0.5mL / ウェルで分注、室温で一晩静置後、液を除去することによりプレートのコートを行った。これらのコート済みプレートを用いて実施例 8 と同様にウシ大動脈由来の血管内皮細胞の培養を行った。対照試験として未コートのプレートを用いた培養を行った。増殖促進作用を実施例 12 と同様に測定し、次の式を用いて各高分子例（各成型物）の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

$$\text{促進率 (\%)} = \frac{\text{(各試験の BrdU 取り込みの増加量)}}{\text{(対照試験の BrdU 取り込みの増加量)}} \times 100$$

得られた結果を表 10 に示した。

【表 10】

表 10	
コートした 高分子例	促進率 (%)
1	198.1
2	184.9
3	179.8
4	182.4
未コート	100.0

表 10 に示したように、高分子例 1 ～ 4 はいずれも優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

#### 実施例 16：製剤製造例

##### 5 錠剤の製造 1

化合物例 1	10 g
ポリエチレングリコール6000	10 g
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5 g
トウモロコシデンプン	3 g
10 乳糖	25 g
ステアリン酸マグネシウム	0.5 g

上記成分を秤量する。ポリエチレングリコール6000を70～80℃に加熱し、そこに化合物例 1、ラウリル硫酸ナトリウム、トウモロコシデンプンおよび乳糖を混合した後、冷却する。固化した混合物を粉碎器にかけ造粒し、顆粒を  
15 得る。顆粒をステアリン酸マグネシウムと混合後、圧縮打錠して重量250mgの錠剤とする。

##### 錠剤の製造 2

化合物例 2	30 g
乳糖	55 g
20 ジャガイモデンプン	12 g
ポリビニルアルコール	1.5 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

上記の成分を秤量する。化合物例 2、乳糖、ジャガイモデンプンを均一に混合する。混合物にポリビニルアルコールの水溶液を加え、湿式顆粒造粒法により顆粒を調製する。顆粒を乾燥し、ステアリン酸マグネシウムを混合後、圧縮打錠して重量200mg の錠剤とする。

5

#### カプセル剤の製造

化合物例 3	10 g
乳糖	25 g
トウモロコシデンプン	5 g
10 微結晶セルロース	9.5 g
ステアリン酸マグネシウム	0.5 g

上記の成分を秤量する。ステアリン酸マグネシウム以外の 4 成分を均一に混合する。ステアリン酸マグネシウムを加えた後、さらに数分間混合する。混合物を No. 1 のハードカプセルに200mg ずつ充填し、カプセル剤とする。

15

#### 散剤の製造

化合物例 4	20 g
乳糖	79 g
ステアリン酸マグネシウム	1 g

20 上記成分を秤量する。すべての成分を均一に混合して20%散剤とする。

#### 坐剤の製造

化合物例 2	10 g
ポリエチレングリコール1500	18 g
25 ポリエチレングリコール4000	72 g

化合物例 2 を乳鉢でよく研磨して微細な粉末とした後、熔融法によって 1 g の直腸坐剤とする。

#### 注射剤の製造

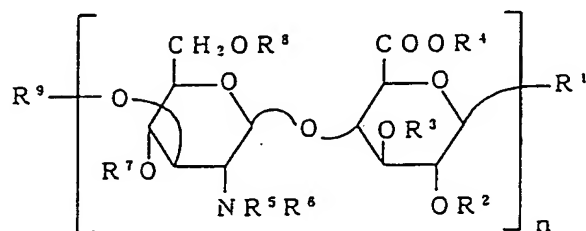
化合物例 6	0.1 g
塩化ナトリウム	0.9 g
水酸化ナトリウム	適量
注射用水	100mL

- 5 上記成分を秤量する。3成分を注射用水に溶解、ろ過滅菌後、10mL アンプルに 5 mL ずつ分注し、熔封して注射剤とする。

## 請求の範囲

1. 下記一般式（１）で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または  
5 塩の溶媒和物。

式（１）



- 〔式（１）中、 $R^1$ は保護基または下記式（２）～（５）を表す。式（２）～  
（５）中、 $R^{10}$ は水素原子、保護基または下記式（６）～（８）を表し、 $R^{11}$ は  
水素原子または保護基を表す。ただし、 $R^{10}$ および $R^{11}$ が水素原子または保護  
基である場合、 $R^1$ は $COOR^4$ に対してトランス結合あるいはシス結合のどちら  
10 であってもよい。

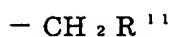
式（２）



式（３）



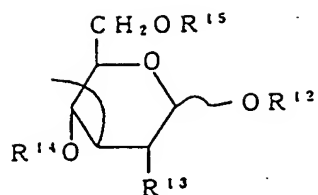
式（４）



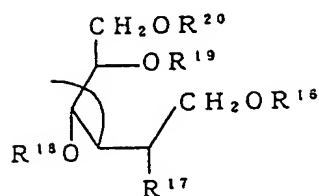
式（５）



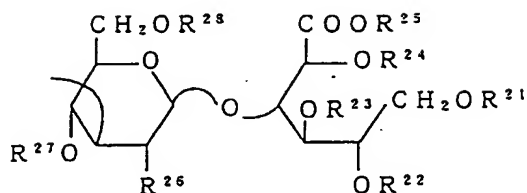
式 (6)



式 (7)

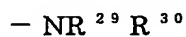


式 (8)



また、 $R^{10}$ が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ および $R^{26}$ を除く $R^{12}$ ～ $R^{28}$ は同一または異なって水素原子または保護基を表し、 $R^{13}$ 、 $R^{17}$ および $R^{26}$ はアジド基または下記式(9)を表す。

式 (9)



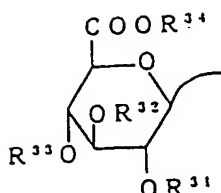
式(9)中、 $R^{29}$ および $R^{30}$ は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。

式(1)中、 $R^2$ ～ $R^8$ は同一または異なって水素原子または保護基を表す。

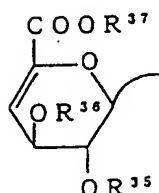
式(1)中、 $R^9$ は、水素原子、保護基または下記式(10)または下記式(11)を表す。

式 (10)





式 (11)



式 (10) および (11) 中、 $R^{31} \sim R^{37}$  は同一または異なって水素原子または保護基を表す。

式 (1) 中、 $n$  は 0 ～ 25 の整数を表す。

(ただし、 $n$  が 0 のときは、 $R^1$  は式 (2)、 $R^{10}$  は式 (8) で表される基であり、 $R^9$  は式 (10) または式 (11) で表される基である。)

式 (1)、式 (6) ～ (8) および式 (10) ～ (11) 中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数 1 ～ 8 の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数 2 ～ 8 の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数 1 ～ 8 のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、また  $R^{13}$ 、 $R^{17}$  および  $R^{26}$  を除く  $R^2 \sim R^{37}$  の任意の保護基 2 つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数 3 ～ 8 のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数 3 ～ 8 の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。

また、 $n$  が 2 以上の場合、 $R^2 \sim R^8$  は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。]

2.  $n = 0 \sim 10$  である請求項 1 記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩

の溶媒和物。

3.  $R^9$ が前記式(11)である請求項2記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

- 5      4.  $R^1$ が前記式(2)であり、 $R^{10}$ が前記式(6)である請求項3記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

- 10      5.  $R^1$ が前記式(2)であり、 $R^{10}$ が前記式(7)である請求項3記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

6.  $R^1$ が前記式(2)であり、 $R^{10}$ が前記式(8)である請求項3記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

- 15      7.  $R^{13}$ が前記式(9)である請求項4記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

8.  $R^{17}$ が前記式(9)である請求項5記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

- 20      9.  $R^{26}$ が前記式(9)である請求項6記載のグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物。

10. ヒアルロン酸またはその塩を解重合する工程を含むことを特徴とする請求項1の化合物を製造する方法。

- 25      11. 解重合のために酵素を用いることを特徴とする請求項10記載の方法。

12. 酵素が微生物由来であることを特徴とする請求項11記載の方法。

13. 微生物が *Streptomyces hyalurolyticus* であることを特徴とする請求項12記載の方法。

14. 解重合を実質上塩を含まない溶液中、実質上不揮発性の塩を含まない溶液

中、あるいは、実質上有機溶媒不溶性の塩を含まない溶液中で行うことを特徴とする請求項10～13のいずれかに記載の方法。

15. 解重合した物質を陰イオン交換クロマトグラフ法によって分画精製する工程を含むことを特徴とする請求項10～14のいずれかに記載の方法。

5. 16. 塩として実質上揮発性の塩のみを含む溶離液を用いることを特徴とする請求項15記載の方法。

17. 塩がアンモニウム塩であることを特徴とする請求項16記載の方法。

18. アンモニウム塩が酢酸アンモニウムであることを特徴とする請求項17記載の方法。

10. 19. 塩として実質上有機溶媒可溶性の塩のみ含む溶離液を用いることを特徴とする請求項15記載の方法。

20. 塩が酢酸塩であることを特徴とする請求項19記載の方法。

21. 酢酸塩が酢酸アンモニウム または酢酸ナトリウムであることを特徴とする請求項20記載の方法。

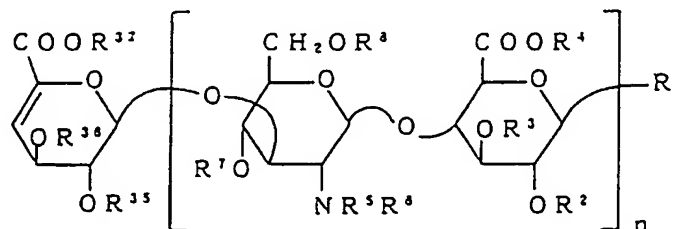
15. 22. 請求項1記載の化合物の少なくともひとつを有効成分とする医薬組成物。

23. 請求項1記載の化合物の少なくともひとつを有効成分とする抗血小板剤。

24. 請求項1記載の化合物の少なくともひとつを有効成分とする血栓症治療薬および予防薬、循環器疾患治療薬および予防薬、脳血管障害治療薬および予防薬、末梢血管障害治療薬および予防薬から成る群より選択される治療薬および予防薬として使用される請求項22記載の医薬組成物。

20. 25. 請求項1記載の化合物を有効成分とする血管内皮細胞増殖促進剤。

26. 以下の式(16)の化合物：



を有効成分とする請求項25記載の血管内皮細胞増殖促進剤。

27. 血管内皮再生療法のための治療薬または予防薬として使用する請求項25記載の血管内皮細胞増殖促進剤。
28. 血管新生療法のための治療薬または予防薬として使用する請求項25記載の血管内皮細胞増殖促進剤。
- 5 29. 請求項1記載の化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子。
30. 請求項1記載の化合物、あるいは、請求項29記載の高分子の少なくともひとつを有効成分とするコーティング剤。
31. 請求項29記載の高分子の少なくともひとつを材料として用いた成型物。
32. 請求項30記載のコーティング剤の少なくともひとつを使用して製造した成型物。
- 10 33. 請求項31または32記載の成型物の少なくともひとつを部品として用いた人工臓器。
34. 体外循環型人工臓器、または、体内埋込み型人工臓器である請求項32記載の人工臓器。
- 15 35. 請求項31または32記載の成型物の少なくともひとつを部品として用いた医療用具。
36. 体外用医療用具、体内と連結する体外用医療用具、または、体内埋込み用医療用具である請求項35記載の医療用具。
37. 請求項29記載の高分子を有効成分として含む細胞培養用組成物。
- 20 38. 請求項31載の成型物および／または請求項30記載のコーティング剤を使用して製造した細胞培養用器材。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02306

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12P19/26, C07H7/033, C07H15/04, A61K31/70, A61K31/715,  
C08B37/00, C08F8/00, C09B201/02, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12P19/26, C07H7/033, C07H15/04, A61K31/70, A61K31/715,  
C08B37/00, C08F8/00, C09B201/02, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY/CA (STN), WPIL/BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO, 96/28730, A1 (Washington Univ.), 19 September, 1996 (19. 09. 96) & EP, 815446, A1 & US, 5733893, A & JP, 11-502197, A	1-9 22-38 10-21
X Y A	Carbohydr. Res. 288 (1996) Blatter G. et al., "The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-D- glucopyranose derivatives in syntheses of hyaluronic acid-related tetra-, hexa-, and octa-saccharides having a methyl beta-D-glucopyranosiduronic acid at the reducing end" p.109-125	1-9 22-38 10-21
X Y	Int. J. Cancer 71 (1997) Deep R. et al., "Early- response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan" p.251-256	1-28 29-38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later than  
the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or priority  
date and not in conflict with the application but cited to understand  
the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step  
when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such combination  
being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 August, 1999 (11. 08. 99)Date of mailing of the international search report  
17 August, 1999 (17. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02306

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 7-278203, A (Collagen Corp.), 24 October, 1995 (24. 10. 95) & EP, 656215, A1 & US, 5470911, A & US, 5476666, A & US, 5510121, A & US, 5510418, A	<u>29-38</u> 1-28
X A	JP, 6-73103, A (Lignite K.K.), 15 March, 1994 (15. 03. 94) & EP, 544259, A1 & AU, 636544, B	<u>29-38</u> 1-28

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02306

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12P19/26, C07H7/033, C07H15/04, A61K31/70, A61K31/715, C08B37/00, C08F8/00, C09B201/02, A61L27/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12P19/26, C07H7/033, C07H15/04, A61K31/70, A61K31/715, C08B37/00, C08F8/00, C09B201/02, A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA (STN)  
WPIL/BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$ A	WO, 96/28730, A1 (Washington Univ.) 19.9月.1996 (19.09.96) & EP, 815446, A1 & US, 5733893, A & JP, 11-502197, A	$\frac{1-9}{22-38}$ 10-21
$\frac{X}{Y}$ A	Carbohydr. Res. 288 (1996) Blatter G. et al "The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-D-glucopyranose derivatives in syntheses of hyaluronic acid-related tetra-, hexa-, and octa-saccharides having a methyl beta-D-glucopyranosiduronic acid at the reducing end" p. 109-125	$\frac{1-9}{22-38}$ 10-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.08.99

国際調査報告の発送日

17.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	Int. J. Cancer 71 (1997) Deep R. et al "Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan" p. 251-256	$\frac{1-28}{29-38}$
$\frac{Y}{A}$	JP, 7-278203, A (コラーゲンコーポレーション) 24. 10月. 1995 (24. 10. 95) & EP, 656215, A1 & US, 5470911, A & US, 5476666, A & US, 5510121, A & US, 5510418, A	$\frac{29-38}{1-28}$
$\frac{Y}{A}$	JP, 6-73103, A (リグナイト株式会社) 15. 3月. 1994 (15. 03. 94) & EP, 544259, A1 & AU, 636544, B	$\frac{29-38}{1-28}$